



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 7/48, 31/70	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/05155 (43) Date de publication internationale: 23 février 1995 (23.02.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01008 (22) Date de dépôt international: 16 août 1994 (16.08.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/10054 17 août 1993 (17.08.93) FR (71)(72) Déposants et inventeurs: ROBERT, Ladislav [FR/FR]; 7, rue Jean-Baptiste-Lully, F-94440 Santeny (FR). ROBERT, Alexandre [FR/FR]; 41, rue François-Couperin, F-94440 Santeny (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): MOCZAR, Elemer [FR/FR]; Allée de Gambaude, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: USE OF OLIGOSACCHARIDES FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF TISSUE AGEING (54) Titre: UTILISATION D'OLIGOSACCHARIDES DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DU VIEILLISSEMENT DES TISSUS (57) Abstract <p>Composition for the treatment or prevention of the symptoms of connective tissue ageing, characterized in that it contains one or more oligosaccharides with 2 to 5 oligosaccharide residues or a derivative of said oligosaccharide(s) containing a hydrophobic residue, with the proviso that one galactose residue be present in a non-reducing terminal position of said oligosaccharide(s).</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une composition pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement du tissu conjonctif caractérisée en ce qu'elle contient au moins un oligosaccharide comprenant de 2 à 5 résidus osidiques, ou un dérivé de celui-ci contenant un résidu hydrophobe, pourvu qu'un résidu galactose soit présent en position terminale non réductrice de l'oligosaccharide.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

UTILISATION D'OLIGOSACCHARIDES DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DU VIEILLISSEMENT DES TISSUS

La présente invention porte sur une composition pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement comportant des oligosaccharides ou des dérivés d'oligosaccharides ayant du D-galactose en position terminale non réductrice, ces dérivés agissant en tant que modulateurs de la synthèse et/ou de l'excrétion de l'élastase de fibroblastes.

Il est connu que le tissu conjonctif au niveau du derme résulte de l'activité biosynthétique des fibroblastes qui élaborent la matrice extracellulaire (Labat-Robert J. et al., Elsevier Science Publisher B.V. 248:386-393, 1990).

La matrice extracellulaire est constituée par quatre familles de macromolécules. Il s'agit des collagènes et de l'élastine qui constituent le matériel fibreux du derme, les glycoprotéines de structure qui assurent la cohésion entre les cellules et la matrice extracellulaire et fournissent le matériel microfibrillaire du tissu élastique ; les protéoglycanes qui assurent l'hydratation des tissus et le contrôle du trafic moléculaire.

L'élastine possède un récepteur complexe dans la membrane des cellules fibroblastiques qui contient une sous-unité de 67 kD qui comporte un site de liaison aux hydrates de carbone.

A. Hinek et al. (Science 239:1539-1541, 1988) ont montré que, lorsque la sous-unité 67 kD du récepteur de l'élastine était immobilisée sur une colonne d'affinité dont le ligand était constitué par de l'élastine ou des peptides de l'élastine, le lactose (1 mM) était capable d'éluer cette protéine 67 kD, et que le galactose était également efficace dans le déplacement de la liaison de la protéine 67 kD à l'élastine.

Au contraire, les oligosaccharides ne contenant pas de galactose sont incapables de permettre l'élution de la protéine 67 kD liée sur la colonne d'affinité élastine.

Les auteurs en ont donc conclu que le récepteur de l'élastine était une protéine ayant des propriétés de liaison aux galactosides.

Il est également connu que les élastines, à l'état soluble ou insoluble, sont susceptibles d'être hydrolysées par des endoprotéases et notamment les élastases.

Différentes classes de protéases et d'endopeptidases ont été répertoriées et une revue de ces différentes endopeptidases et de leurs propriétés a été publiée par Barrett et al., 1977 (Barrett A.J. Eds., North Holland, Amsterdam).

Les élastases sont des protéases et endopeptidases dont les propriétés commencent à être bien étudiées. Les articles suivants dont le contenu peut être incorporé dans le présent texte par référence décrivent ces propriétés, il s'agit de :

- Bieth J. (1978) "Elastase : structure, function and pathological role". Front. of Matrix Biol. Cis.: 1-82 et
- Homsy R. et al. (1988) "Characterization of human skin fibroblasts elastase activity". Journ. Invest. Dermatol. 91:472-477.

La désignation d'une enzyme sous l'appellation d'élastase n'implique pas que cette protéase soit spécifique de l'élastine. En fait, les élastases hydrolysent une grande variété de substrats protéiques et l'élastase leucocytaire par exemple est capable de cliver pratiquement toutes les macromolécules du tissu conjonctif (Robert L. 1988, Path. Biol.; 36:1101-1107).

Ces protéases de type élastase sont capables de dégrader les fibres élastiques des tissus, ainsi

d'ailleurs que d'autres constituants comme les fibres de collagène ou les glycoprotéines, par exemple la fibronectine. Ce type de phénomène a été décrit dans les phénomènes de vieillissement cellulaire ; de nombreux travaux ont montré que la synthèse et l'accumulation de ce type d'enzymes augmente au cours du vieillissement, on peut citer notamment :

- Labat-Robert J. et al., Ann. New York Acad. Sci. (1992), 673:16-22,
- Robert J. Sang Thrombose Vaisseaux (1991), 3:267-330,
- Robert L. Pathol. Biol. (1988), 36:1101-1107.

Ces mêmes protéases et endopeptidases sont également capables de dégrader les constituants matriciels d'autres organes, par exemple l'élastine des poumons, induisant ainsi un emphysème pulmonaire, ou encore de dégrader les lames élastiques des artères, et l'élastine et le collagène des veines, favorisant ainsi le développement de maladies vasculaires : athérosclérose et artériosclérose des artères, et varicoses des veines. Toutes ces pathologies voient leur fréquence et leur gravité augmenter avec l'âge.

D'autres endopeptidases de même nature (métallo-endopeptidases à Zn) sont capables d'activer l'angiotensine I inactive, en angiotensine II qui peut déclencher une hypertension artérielle sévère.

Enfin, les enképhalinases, d'autres endopeptidases à Zn de même nature, interfèrent avec le fonctionnement des enképhalines et, selon l'importance de leurs excès, peuvent induire des perturbations dans le fonctionnement du cerveau.

Le dénominateur commun de toutes ces endopeptidases agissant sur des substrats différents et induisant des pathologies très diverses est qu'elles possèdent un site actif à Zn et sont toutes liées à la membrane cellulaire.

Dans la description qui va suivre, le cas de l'élastase des fibroblastes de la peau sera traité, mais le mécanisme physiopathologique et le principe du traitement qui seront présentés sont également valables pour les autres endopeptidases et les autres pathologies dont l'énumération non limitative a été donnée ci-dessus.

La présente invention est relative à des compositions pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement du tissu conjonctif, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un oligosaccharide de 2 à 5 résidus osidiques ou un dérivé de celui-ci, contenant un galactose en position terminale non réductrice.

L'invention concerne une composition caractérisée en ce qu'elle est utilisée pour le traitement des manifestations du vieillissement cutané, quand les oligosaccharides ou leurs dérivés sont associés à un véhicule compatible avec une administration cosmétique, et de préférence topique.

L'invention est également relative aux compositions pour le traitement ou la prévention des manifestations de vieillissements accélérés au niveau de la trame fibreuse du tissu conjonctif accompagnant certaines pathologies, notamment des pathologies cardio-vasculaires et l'emphysème pulmonaire, ladite composition contenant les oligosaccharides ou dérivés de ceux-ci ayant un galactose en position terminale non réductrice.

Les oligosaccharides entrant dans la composition pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement cutané ou de vieillissements accélérés au niveau de la trame fibreuse du tissu conjonctif sont, de préférence, le lactose, le mélbiose, la stacchiose ou des dérivés de l'un de ces sucres ou un mélange de ceux-ci.

Les dérivés d'oligosaccharides qui peuvent rentrer dans une composition selon l'invention comportent tous un résidu du galactose en position terminale non réductrice ; ils peuvent rentrer dans les catégories citées ci-après, dans lesquelles l'oligoside répond à la formule générale suivante :

galactose- $_n(\alpha \text{ ou } \beta)$ -(Hex) $_n$,

dans laquelle

n représente la position 1, 2, 3, 4 ou 6,

Hex représente un pentose ou un hexose en liaison α ou β ,

n' est un nombre compris entre 1 et 5;

a)- des glycosides répondant aux formules :

. (I) oligoside 1-O-R, dans lequel R est un résidu alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, linéaire ou branché,

. (II) oligoside 1-O-R-O-1-oligoside dans laquelle $R = (CH_2)_n$, n étant compris entre 2 et 10,

b)- une osylamine acylée selon l'une des formules suivantes, dans lesquelles l'oligoside est de préférence le lactose, le mélibiose ou le stachiose :

- des osylamines acylées répondant à l'une des formules suivantes :

. (III) oligoside 1-NH-CO-R, dans laquelle R est un résidu alkyle de 2 à 18 atomes de carbone, contenant 0, 1 ou 2 double liaisons,

. (IV) oligoside 1-NH-CO-R-CO-NH-1-oligoside, dans laquelle

$R = (CH_2)_n$, n étant compris entre 2 et 8,

c)- une alkylamine acylée par un acide aldonique obtenu par oxydation d'un oligoside,

. (V) oligoside-CO-NH-R, dans laquelle R a la même signification que dans la formule (III),

. (VI) oligoside CO-NH-R-NH-CO-oligoside, où R a la même signification que dans la formule (III),

d)- soit un produit de réduction des bases de Schiff formé par des oligosides avec des mono- ou diamines aliphatiques, et répondant à l'une des formules suivantes :

- . (VII) Gal-(Hex)_n-X-HN-R,
- . (VIII) Gal-(Hex)_n-X-HN-R-NH-X-(Hex)_n-Gal,

dans lesquelles :

Hex est un hexose ou un pentose,

n = 0, 1 ou 2,

X = 1-NH₂-hexitol, et

R a la même signification que dans (III).

L'ensemble de ces oligosaccharides ou de leurs dérivés décrits plus haut ont en commun la caractéristique de diminuer d'au moins 20% la synthèse et/ou la sécrétion de l'élastase dans des fibroblastes en culture.

Cet effet se manifeste par la diminution de l'activité enzymatique dosable dans le milieu de culture de ces cellules, ainsi que dans les cellules elles-mêmes.

La méthode utilisée consiste à cultiver les fibroblastes de peau humaine dans des conditions standards et à déterminer par une méthode colorimétrique, à l'aide d'un substrat synthétique (le N-succinyl-trialanyl-paranitroanilide), l'activité élastasique de la culture.

En utilisant ce substrat synthétique, il a pu également être montré que la biosynthèse des endopeptidases de type élastase augmente au cours des passages successifs des fibroblastes constituant ainsi un système de vieillissement in vitro selon le modèle de Hayflick (1980, Cell Adding In. Annual Review of Gerontology and Geriatrics ; Springer, New York 1:26-67) ; Labat-Robert J. et al. (1988, Expert Gerontol. 23:5-18).

L'activité enzymatique est essentiellement associée avec la membrane cellulaire et peut être récupérée après trypsinisation des fibroblastes dans une fraction soluble.

Deux à 10% de l'activité totale peuvent être récupérés dans les milieux de culture et le reste est associé avec les résidus cellulaires et peuvent être solubilisés à l'aide d'un détergent.

La présente invention est relative à l'utilisation des oligosaccharides ou de leurs dérivés décrits plus haut pour contrôler la biosynthèse et la sécrétion des protéases de type élastase à partir de fibroblastes par le récepteur de l'élastine présent sur les fibroblastes humains, notamment les fibroblastes de la peau, ce contrôle ayant pour effet de prévenir ou traiter les manifestations du vieillissement cutané, ou celles du vieillissement accéléré lié aux pathologies dues notamment à une présence excessive d'endopeptidases.

En effet, comme il a été dit plus haut, la sous-unité de 67 kD du récepteur de l'élastine possède une structure réagissant spécifiquement avec le lactose ou des structures oligo- ou polysaccharidiques contenant du galactose en position terminale (Labat-Robert J. et al., cité ci-dessus et Mecham R.P. et al. 1989, Biochem. 28:3716-3722).

Les dérivés d'oligosaccharides entrant dans la composition de l'invention peuvent être synthétisés soit chimiquement, comme il sera expliqué plus loin dans les exemples, soit extraits à partir de milieux biologiques, notamment le lait, le sang ou le placenta, ou encore de produits naturels comme le miel qui contient des galactosides intéressants pour la préparation des compositions de l'invention (R. Siddiqui, in Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Ed: D. Horton vol. 49, pp. 285-309).

Les polysaccharides ou leurs dérivés peuvent ainsi être extraits par des méthodes classiques (Frontiers of Matrix Biology (1985), vol. 10, S. Kargar Edition), puis subir soit une dégradation enzymatique, soit une hydrolyse chimique et enfin le composé d'intérêt est séparé soit par précipitation saline, ou chromatographie d'échange d'ions ou chromatographie sur gel de Sepharose, ou par tout autre procédé adéquat.

La présente invention est également relative au procédé de préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement des effets du vieillissement cutané caractérisé en ce qu'il comprend l'incorporation dans un véhicule acceptable pour une administration locale d'un oligosaccharide de 2 à 5 résidus osidiques comprenant un galactose en position terminale non réductrice ou d'un dérivé d'un tel oligosaccharide, lequel représente 0,5 à 6% en poids sur volume de ladite composition.

Cette composition peut être avantageusement utilisée en dermatologie et/ou cosmétologie pour le traitement ou la prévention des effets du vieillissement cutané.

De la même manière, l'invention est relative à un procédé de préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement des manifestations de vieillissement accéléré au niveau de la trame fibreuse du tissu conjonctif accompagnant certaines pathologies liées à une synthèse anormale d'élastase, notamment l'emphysème pulmonaire, l'athérosclérose et artériosclérose des artères et varicoses des veines, ou enfin dans le traitement ou la prévention de l'hypertension artérielle lorsque des endopeptidases de type élastases sont responsables de l'activation de l'angiotensine I en angiotensine II ; cette utilisation est caractérisée par l'incorporation dans une composition, en association avec un véhicule

pharmaceutique acceptable, d'un oligosaccharide ou un dérivé d'oligosaccharide comportant un galactoside en position terminale non réductrice.

Lorsque le dérivé d'oligosaccharides comprend un résidu hydrophobe, un véhicule avantageux peut être constitué de liposomes, permettant de présenter la fraction osidique du dérivé à leur surface.

Dans les exemples détaillés qui suivent, il est montré l'effet du lactose, du mélibiose du stachiose et de leurs dérivés sur la synthèse et la sécrétion d'élastase à partir de fibroblastes humains ayant subi de 15 à 25 passages : les cellules ainsi traitées sont des cellules qui entrent dans une phase de sénescence selon le modèle de Hayflick (référence supra) et constituent donc le modèle de vieillissement in vitro.

La diminution observée de la synthèse et de la sécrétion d'élastase dans un tel système par l'administration des dérivés d'oligosaccharides de l'invention, est un indice de l'effet de ces composés anti-vieillissement puisque, comme nous l'avons vu plus haut, l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'élastase sont des phénomènes liés au vieillissement de ces fibroblastes.

Ces exemples ne sont pas limitatifs d'un effet sur les fibroblastes de la peau, mais peuvent être généralisés à tout type de cellules fibroblastiques et autres cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, leucocytes possédant dans leur membrane un récepteur de l'élastine, lequel récepteur comprend une sous-unité de 67 kD ayant une affinité pour les galactosides.

- Matériel et méthodes :

Les fibroblastes de la peau humaine ont été obtenus de biopsies de peau prélevée au cours d'une

chirurgie plastique mammaire d'une femme âgée entre 16 et 24 ans.

Les cellules sont cultivées dans un milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) avec 10% de sérum de veau foetal, 200 $\mu\text{g/ml}$ de pénicilline et 200 unités/ml de streptomycine dans une atmosphère 90/10% d'oxygène/azote dans des bouteilles en plastique NUNCLON-DELTA de 35x10 mm.

Les expériences sont réalisées entre le 18ème et le 21ème passage, dans la mesure où c'est à ce niveau là que l'activité élastasique augmente et reflète l'état de sénescence des cellules.

Vingt-quatre heures avant les expériences, le milieu est retiré et 1 ml de milieu DMEM frais a été ajouté avec du lactose à la concentration finale de 10 mM.

Après des intervalles de temps déterminés, le milieu a été enlevé, la couche de cellules rincée deux fois avec 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) qui a été ajouté au milieu.

La couche de cellules a ensuite été traitée avec une solution fraîche de trypsine (Worthington) à 20 μg dans 1 ml de PBS pendant 5 min. à 37°C, suivie par une centrifugation à 100 g pendant 5 min. à 4°C.

Après décantation et rinçage avec 1 ml de PBS, les résidus cellulaires sont suspendus dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7.4, contenant 0,1% de Triton x-100 et homogénéisés dans un homogénéiseur Potter.

Le surnageant de cette suspension a été utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique liée aux cellules.

La détermination de l'activité enzymatique de type élastase a été faite par addition du substrat (N-succinyl-trialanyl-paranitroanilide ou N-suc-ala₃p-Na) à une concentration de 125 mM dans le diméthylformamide

à un aliquot d'extraits cellulaires selon la technique décrite dans Bieth. J. 1978 (voir supra).

Pour le milieu de culture, 56 μ l ont été ajoutés à 890 μ l de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7.8 et 10 μ l de la solution de substrat.

Cinquante μ l du trypsinat ou de résidus cellulaires ont été ajoutés à 940 μ l de tampon Tris et à 10 μ l de substrat.

Les incubations sont réalisées à 37°C pendant 3 h pour le milieu de culture, 1 h pour le trypsinat et pour le résidu cellulaire.

La densité optique de la couleur jaune qui se développe par action de l'enzyme sur le substrat est lue à 410 nanomètres dans un spectrophotomètre.

Toutes les expériences sont réalisées sur 4 à 6 cultures en parallèle, et des valeurs moyennes sont comparées statistiquement avec le t-test de Student.

L'activité enzymatique (AE) est exprimée en nM de substrat hydrolysé par heure et par 10^6 cellules, calculée de la façon suivante :

$$AE = \frac{DO \times v \text{ total}}{8,8 \times v \text{ échantillon} \times N \times T} \times 10^6$$

où :

- DO est la densité optique,
- N est le nombre de cellules dans le volume réactionnel,
- T est le temps d'incubation, et
- 8,8 est le coefficient d'extinction molaire correspondant à la DO de la solution molaire de substrat dans une cuve de 1 cm d'épaisseur.

Dans les différents exemples qui suivent, l'effet du galactose et de ses dérivés sur la modification de l'activité élastasique des fibroblastes a été étudié en

mesurant la modification de cette activité par un peptide de l'élastine : la kappa-élastine (KE) ; ce peptide a été obtenu par une hydrolyse d'élastine du ligament nuqual du boeuf, par hydrolyse alcaline dans l'éthanol aqueux selon la technique décrite dans Robert L. et Poullain N. (Etudes sur la structure de l'élastine et le mode d'action de l'élastase. I. Nouvelle méthode de préparation de dérivés solubles de l'élastine. Bull. Soc. Chim. Biol. 45:1317-1326 (1963)).

Ce peptide a en effet la propriété d'être un agoniste du récepteur de l'élastine, c'est-à-dire que sa présence conduit à une augmentation de l'activité élastase des fibroblastes en culture.

Le tableau 1 ci-dessous montre la cinétique d'actions de la kappa-élastine à 1 mg/lamelle sur l'activité élastasique des fibroblastes humains au vingtième passage en fonction du temps d'incubation.

Tableau 1
TEMPS D'INCUBATION AVEC LA KE

	0 h	2 h	6 h	24 h	48 h
AE DMEM	0,04	0,04	0,03	0,21	0,99
AE TRYPS	0,267	0,2	0,207	0,190	0,123

On note une forte augmentation de l'activité élastasique dans le milieu de culture (sécrétion) après un temps de latence de 24 h. En même temps, l'activité membranaire dans le trypsinat baisse. Il apparaît donc que l'augmentation de l'activité dans le milieu

pourrait être liée au relargage de l'enzyme membranaire dans le milieu.

- EXEMPLE 1 : Etude de l'action du lactose :

La concentration utilisée de lactose est de 10 mM ou de 3,6 mg/ml. Le tableau 2 ci-dessous montre l'effet du lactose 10 mM sur l'activité élastase des fibroblastes humains au 21ème passage et sur sa distribution entre la forme libre, membranaire (trypsinat) et liée à la cellule (après effet du Triton).

L'activité est indiquée en densité optique du substrat hydrolysé, multipliée par $10^3/h$ pour 10^6 cellules.

Une moyenne de 4 mesures parallèles sur des cultures différentes a été calculée.

La distribution de l'activité entre les trois compartiments est indiquée comme un pourcentage du total, de même que l'inhibition par le lactose est indiquée en pourcentage de l'activité équivalente en l'absence de lactose.

Tableau 2

	Contrôle		Lactose		
	Activité	% du total	Activité	% du total	%
Activité totale	588.1	100	262.2	100	55
Milieu de culture	56.1±7.6	10	18.8±1.1	7	66
Trypsinat	359.5±41.7	61	91.9±31.7*	35	74
Cellulaire	172.5±16.8	29	151.5±28.8	58	12

* $p < 0.05$ en comparant le contrôle avec le lactose.

Ce tableau montre une réduction de 55% de l'activité totale, ainsi qu'un changement de la distribution de l'activité enzymatique dans les trois fractions.

L'enzyme libre mesurée dans le milieu de culture diminue de 66% comparé à la culture contrôle et l'enzyme associée à la membrane relargable par la trypsine baisse de 74% tandis que l'activité résiduelle (cellulaire) ne montre pas de différence significative avec le contrôle.

Cette inhibition sélective des activités liées à la membrane et relarguées dans le milieu modifie la distribution de l'activité totale.

Dans les cultures contrôles, la majeure partie de l'activité totale est associée à la membrane cellulaire (61%) et relargable par la trypsine ; dans les cultures traitées au lactose, seulement 35% de l'activité totale sont relargués par la trypsine ; 58% sont associés aux résidus cellulaires.

Il apparaît ainsi que le lactose a pour effet de diminuer la synthèse de l'enzyme et le relargage.

- EXEMPLE 2 : Etude de l'action du mélibiose sur la synthèse d'élastase :

Le mélibiose est ajouté au milieu de culture à la concentration de 10 mM, soit 3,4 mg/ml et ce, dans les mêmes conditions de culture que le lactose.

Le mélibiose provoque une diminution de l'activité enzymatique dans le milieu de 60% par rapport au témoin et une diminution dans le trypsinat de 80%, ainsi qu'une faible diminution dans le culot cellulaire.

L'activité enzymatique totale est diminuée de 50%.

- EXEMPLE 3 : Action du stachiose :

Le stachiose est un tétrasaccharide qui a été préparé selon la technique de M.L. Wolfrom et A.

Thompson décrite dans Methods of Carbohydrate Chemistry I p. 368-369, Academic Press, 1962.

Le stachiose a été ajouté au milieu de culture à la concentration de 10 mM, soit 6,6 mg/ml.

Il a pour effet de diminuer l'activité enzymatique dans le trypsinat de 30% par rapport au témoin, alors qu'il augmente légèrement dans le milieu.

En présence de kappa-élastine à la concentration de 1 mg/ml, il diminue l'activité enzymatique significativement dans le milieu (52%) par rapport à l'effet de la kappa-élastine seule.

Dans le trypsinat, on observe une augmentation de 32% toujours par rapport à l'effet de la kappa-élastine seule.

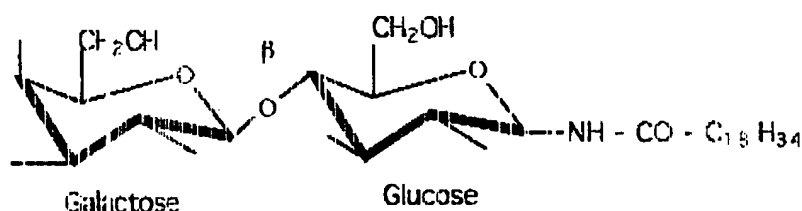
L'activité enzymatique dans les culots ne varie pas d'une façon significative.

- EXEMPLE 4 : Action de l'oleoyl-lactosylamine :

L'oleoyl-lactosylamine est un composé répondant à la formule X et sa synthèse est nouvelle.

a) Synthèse de l'oleoyl-lactosylamine :

Du 1-amino lactose réagit avec du l'oleoyl-chlorure pour donner le lactobionyl-oléylamine de formule suivante :



On dissout 3,3 g de lactosylamine dans 30 ml de méthanol à 80° et on y ajoute 1,2 g de diéthylamine. On ajoute à cette solution 4 g de chlorure d'oleoyl, sous agitation, à une température ne dépassant pas 30°C.

Le pH du mélange est porté à 3 par l'addition de HCl. L'acide oléique est éliminé par extraction par heptane. On fait passer la phase méthanolique-aqueuse successivement par les colonnes d'échangeur d'ions acides et basiques et on chasse les solvants sous vide.

Le produit obtenu renferme encore environ 20% de lactose. L'oléoyl-lactosylamine peut être purifié sur une colonne d'octyl-Sepharose.

Rf = sur silice (MeOH couche mince), 0,8 (chloroforme-méthanol 1:1, v/v).

b) Effet sur les cultures sénescents de fibroblastes :

L'oléoyl-lactosylamine est ajouté à la concentration de 0,5 mM.

A cette concentration, il provoque une faible augmentation de l'activité dans le trypsinat et une baisse dans les culots cellulaires d'environ 20%.

- EXEMPLE 5 : Action du dimélibionityl-diaminohexane :

a) Préparation du dimélibionityl-diaminohexane:

Ce produit a été synthétisé par une technique nouvelle décrite ci-après.

On dissout 374 mg mélibiose (1,1 mM) et 116 mg (0,5 mM) de diaminohexane dans 5 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 8, et on y ajoute 270 mg de cyanoborohydrure de sodium (4,4 mM). On abandonne le mélange 11 jours à la température ambiante, et on chauffe à 37°C pendant 2 jours. On fait passer la solution sur échangeur d'ions acides (H+) et on lave la colonne par l'eau.

La substance est éluée ensuite par une solution de 0,5 M d'ammoniaque, et on lyophilise la solution. Le rendement est de 200 mg de di-mélibionityle-diaminohexane.

Rf sur silice = (Butanol-acide acétique-eau, h = 1:1) 0,2.

La figure 1 représente le schéma réactionnel conduisant aux dérivés dimélibionityl-diaminohexanes.

b) Action du diméliobionityl-diaminohexane sur l'activité enzymatique des cultures de fibroblastes humains :

On observe une augmentation de l'activité enzymatique dans le milieu, ainsi qu'une diminution de 40% dans le trypsinat par rapport au témoin.

En présence de kappa-élastine, l'activité diminue de 71% dans le milieu, sans augmentation dans le trypsinat.

Par contre, l'activité récupérée dans les culots cellulaires augmente légèrement par rapport à l'action de la kappa-élastine seule, mais ne déplace pas la valeur du témoin.

c) Comparaison des différents effets :

Le tableau 3 suivant résume l'ensemble des résultats obtenus avec les différents dérivés galactosides sur l'activité élastasique des fibroblastes humains :

TABLEAU IV : ACTION SUR L'ACTIVITE ELASTASIQUE

SUBSTANCE	TOTAL	DMEM	TRYPSINAT	CULOTS C.
<u>LACTOSE</u>	↓27%	↓30%	↓70%	↓30%
LACTOSE+KE	↑13,5%	↑20%	↑50%	↓30%
<u>MELIBIOSE</u>	↓58%	↓60%	↓80%	↓30%
MELIBIOSE+KE	↑15%	↓27%	↑31%	↑9%
<u>STACHIOSE</u>	↓17%	↑14%	↓35%	-
STACHIOSE+KE	↓17%	↓56%	↑32%	-
CARRAGEENAN	↑28%	-	↑66%	↑30%
CARRAGEENAN+KE	-	↓28%	↑29%	-
<u>L.O.AMINE</u>	↓15%	↑44%	↑61%	↓19%
L.O.AMINE+KE	↓27%	-	↑41%	↓32%
M.L.AMINE	↑13%	↓10%	↓15%	↑50%
M.L.AMINE+KE	↑40%	↑11%	↑17%	↑50%
AMB	↓23%	↑67%	-	↓35%
AMB+KE	↓7%	↓60%	↓20%	↓23%
<u>DMDAH</u>	-	↑67%	↓53%	-
DMDAH+KE	↑23%	↑70%	↓18%	↑34%
MDH	↑58%	↓60%	↑37%	↑60%
MDH+KE	↑54%	↓80%	↑14%	↑56%

LOAMINE- LACTOBIONYL-OLEYLAMINE

MLAMINE- MYRISTOYL-LACTOSYLAMINE

AMB- ACIDE MELIBIONIQUE

DMDAH- DIMELIBIONITOYL-DIAMMINOHEXANE

MDH- DIMELIBIITYL-DIAMMINOHEXANE

Les dérivés soulignés sont ceux qui sont indiqués dans les exemples précédents.

- EXEMPLE 6 : Effet chez le rat nu du lactose et du méliobiose :

Deux groupes de rats sont traités et comparés, l'un avec le lactose ou le mélibiose, l'autre par un placebo.

Puis, les rats sont irradiés avec une dose de 3 MED (pour dose minimale érythémateuse).

Le dosage d'activité élastasique est mesurée au niveau de biopsies prélevées sur les rats irradiés, par la méthode décrite dans Matériels et méthode.

REVENDICATIONS

1. Composition pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement du tissu conjonctif caractérisée en ce qu'elle contient au moins un oligosaccharide comprenant de 2 à 5 résidus osidiques, ou un dérivé de celui-ci contenant un résidu hydrophobe, pourvu qu'un résidu galactose soit présent en position terminale non réductrice de l'oligosaccharide.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est utilisée pour le traitement des manifestations du vieillissement cutané, quand les oligosaccharides ou leurs dérivés sont associés à un véhicule compatible avec une administration cosmétique, et de préférence topique.

3. Composition selon la revendication 1, pour le traitement ou la prévention des manifestations du vieillissement accéléré au niveau de la trame fibreuse du tissu conjonctif accompagnant certaines pathologies, caractérisée en ce que l'oligosaccharide ou son dérivé est associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'oligosaccharide répond à la formule suivante :

galactose-_n(α ou β)-(X)_{n'},

dans laquelle

n représente la position 1, 2, 3, 4 ou 6,

X représente un pentose ou un hexose en liaison α ou β ,

n' est un nombre compris entre 1 et 5,

un tel oligoside pouvant être notamment le lactose, ou le méliobiose ou le stachiose, ou un mélange de ceux-ci.

5. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le dérivé d'oligosaccharide est choisi dans l'une des catégories suivantes :

a)- un glycoside selon l'une des formules suivantes, dans lesquelles l'oligosaccharide est un oligoside de préférence le lactose, le mélibiose ou le stachiose :

. (I) oligoside 1-O-R, dans lequel R est un résidu alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, linéaire ou branché,

. (II) oligoside 1-O-R-O-1-oligoside dans laquelle $R = (CH_2)_n$, n étant compris entre 2 et 10,

b)- soit une osylamine acylée selon l'une des formules suivantes, dans lesquelles l'oligoside est de préférence le lactose, le mélibiose ou le stachiose :

. (III) oligoside 1-NH-CO-R, dans laquelle R est un résidu alkyle de 2 à 18 atomes de carbone, contenant 0, 1 ou 2 double liaisons,

. (IV) oligoside 1-NH-CO-R-CO-NH-1-oligoside, dans laquelle

$R = (CH_2)_n$, n étant compris entre 2 et 8,

c)- une alkylamine acylée par un acide aldonique obtenu par oxydation d'un oligoside,

. (V) oligoside-CO-NH-R, dans laquelle R a la même signification que dans la formule (III),

. (VI) oligoside CO-NH-R-NH-CO-oligoside, où R a la même signification que dans la formule (III),

d)- soit un produit de réduction des bases de Schiff formé par des oligosides avec des mono- ou diamines aliphatiques, et répondant à l'une des formules suivantes :

. (VII) Gal-(Hex)_n-X-HN-R,

. (VIII) Gal-(Hex)_n-X-HN-R-NH-X-(Hex)_n-Gal,
dans lesquelles :

Hex est un résidu d'un hexose (ou pentose),
n = 0, 1 ou 2,

X = résidu d'un hexitol (ou pentitol), et

R a la même signification que dans (III).

6. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les dérivés d'oligosaccharides sont obtenus par synthèse chimique.

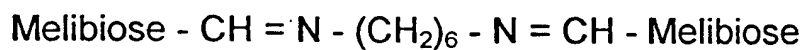
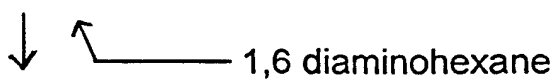
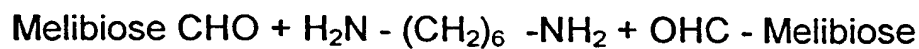
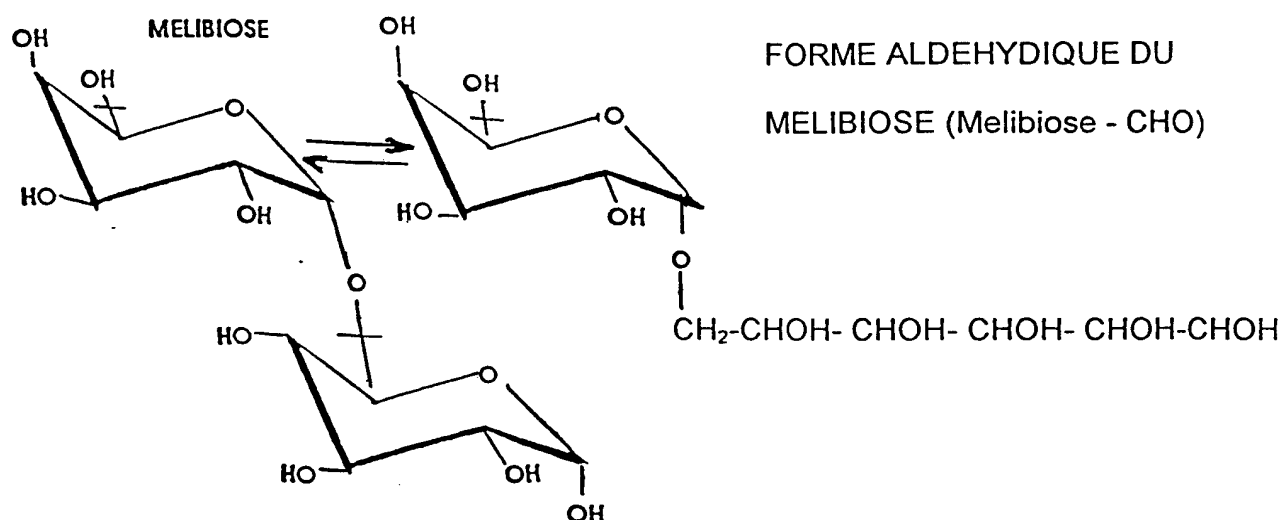
7. Procédé de préparation des composés selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) extraction des sucres à partir d'un milieu biologique, notamment le lait, le sang ou le placenta,
- b) dégradation enzymatique des sucres extraits ou hydrolyse chimique,
- c) séparation du composé recherché.

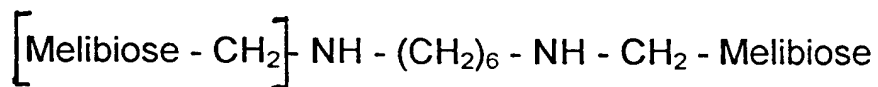
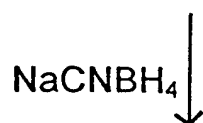
8. Procédé de préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement des effets du vieillissement caractérisé en ce qu'il comprend l'incorporation dans un véhicule acceptable pour une administration locale d'un oligosaccharide de 2 à 5 résidus osidiques comprenant un galactose en position terminale non réductrice ou d'un dérivé d'un tel oligosaccharide, lequel représente 0,5% à 6%, de préférence 1 à 4%, en poids sur volume de ladite composition.

9. Utilisation en dermatologie d'une composition selon l'une des revendications 1 à 4, avec un véhicule permettant une administration cutanée.

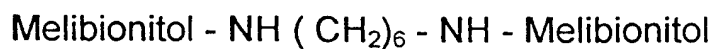
1/1



(base de Schiff instable)



MELIBIONITOL



di - melibionityl - diaminohexane

FIGURE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/FR 94/01008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61K7/48 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 00067 (BIOEUROPE) 7 January 1993 see the whole document ---	1-9
X	DATABASE WPI Week 939, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-071012 & JP,A,5 017 332 (SHISEIDO) 26 January 1993 see abstract ---	1-9
X	DATABASE WPI Week 931, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-004724 & JP,A,4 332 795 (LION CORP.) 19 November 1992 see abstract ---	1-9
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1994

Date of mailing of the international search report

01.12.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fischer, J.P.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/FR 94/01008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 9049, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-366300 & JP,A,2 265 458 (NIKKEN FOOD KK) 30 October 1990 see abstract</p> <p>---</p>	1,3,4,6, 7
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 9, no. 32 (C-265) (1755) 9 February 1985 & JP,A,59 176 203 (KANEBO KK) see abstract</p> <p>---</p>	1-4,6-9
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 167 (C-425) (2614) 28 May 1987 & JP,A,62 000 412 (SHISEIDO CO) see abstract</p> <p>---</p>	1-4,6-9
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, no. 230 (C-508) (3077) 29 June 1988 & JP,A,63 023 808 (NOEBIA KK) see abstract</p> <p>---</p>	1-4,6-9
X	<p>US,E,28 781 (KÖNIG ET AL.) 20 April 1976 see column 2, line 3 - line 19; claims 1,14-18</p> <p>---</p>	1-4,6-9
X	<p>EP,A,0 133 170 (KARLSSON ET AL.) 13 February 1985 see the whole document</p> <p>---</p>	1-9
X	<p>US,A,4 895 838 (MCCLUER ET AL.) 23 January 1990 see the whole document</p> <p>---</p>	1-9
X	<p>EP,A,0 504 645 (F.HOFFMANN-LA ROCHE) 23 September 1992 see the whole document</p> <p>---</p>	1,3,6,7
X	<p>FR,A,2 609 397 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES) 15 July 1988 see the whole document</p> <p>-----</p>	1-4,6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/FR 94/01008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9300067	07-01-93	FR-A- 2678166 AU-A- 2243492 CA-A- 2112237 EP-A- 0591443 JP-T- 6508832	31-12-92 25-01-93 07-01-93 13-04-94 06-10-94
US-E-28781	20-04-76	BE-A- 701629 CH-A- 495149 DE-A,B,C 1568320 FR-A- 1541055 GB-A- 1199055 LU-A- 54243 NL-A- 6710627 SE-B- 360261 US-A- 3578655	22-01-68 31-08-70 02-01-70 15-07-70 03-10-67 20-02-68 24-09-73 11-05-71
EP-A-0133170	13-02-85	AU-B- 581850 AU-A- 3049384 JP-A- 60064993	09-03-89 17-01-85 13-04-85
US-A-4895838	23-01-90	NONE	
EP-A-0504645	23-09-92	AU-B- 651668 AU-A- 1212792 JP-A- 5097884	28-07-94 17-09-92 20-04-93
FR-A-2609397	15-07-88	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 94/01008

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K7/48 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 00067 (BIOEUROPE) 7 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-9
X	DATABASE WPI Week 939, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-071012 & JP,A,5 017 332 (SHISEIDO) 26 Janvier 1993 voir abrégé ---	1-9
X	DATABASE WPI Week 931, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-004724 & JP,A,4 332 795 (LION CORP.) 19 Novembre 1992 voir abrégé ---	1-9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 Novembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01.12.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fischer, J.P.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 94/01008

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Week 9049, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-366300 & JP,A,2 265 458 (NIKKEN FOOD KK) 30 Octobre 1990 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,3,4,6, 7
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 9, no. 32 (C-265) (1755) 9 Février 1985 & JP,A,59 176 203 (KANEBO KK) voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-9
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 167 (C-425) (2614) 28 Mai 1987 & JP,A,62 000 412 (SHISEIDO CO) voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-9
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, no. 230 (C-508) (3077) 29 Juin 1988 & JP,A,63 023 808 (NOEBIA KK) voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-9
X	<p>US,E,28 781 (KÖNIG ET AL.) 20 Avril 1976 voir colonne 2, ligne 3 - ligne 19; revendications 1,14-18</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-9
X	<p>EP,A,0 133 170 (KARLSSON ET AL.) 13 Février 1985 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
X	<p>US,A,4 895 838 (MCCLUER ET AL.) 23 Janvier 1990 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
X	<p>EP,A,0 504 645 (F.HOFFMANN-LA ROCHE) 23 Septembre 1992 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,3,6,7
X	<p>FR,A,2 609 397 (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES) 15 Juillet 1988 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-4,6-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 94/01008

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9300067	07-01-93	FR-A- 2678166	31-12-92
		AU-A- 2243492	25-01-93
		CA-A- 2112237	07-01-93
		EP-A- 0591443	13-04-94
		JP-T- 6508832	06-10-94

US-E-28781	20-04-76	BE-A- 701629	22-01-68
		CH-A- 495149	31-08-70
		DE-A, B, C 1568320	02-01-70
		FR-A- 1541055	
		GB-A- 1199055	15-07-70
		LU-A- 54243	03-10-67
		NL-A- 6710627	20-02-68
		SE-B- 360261	24-09-73
		US-A- 3578655	11-05-71

EP-A-0133170	13-02-85	AU-B- 581850	09-03-89
		AU-A- 3049384	17-01-85
		JP-A- 60064993	13-04-85

US-A-4895838	23-01-90	AUCUN	

EP-A-0504645	23-09-92	AU-B- 651668	28-07-94
		AU-A- 1212792	17-09-92
		JP-A- 5097884	20-04-93

FR-A-2609397	15-07-88	AUCUN	

PUB-NO: WO009505155A1
DOCUMENT-IDENTIFIER: WO 9505155 A1
TITLE: USE OF OLIGOSACCHARIDES FOR
THE PREVENTION AND TREATMENT
OF TISSUE AGEING
PUBN-DATE: February 23, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ROBERT, LADISLAS	FR
ROBERT, ALEXANDRE	FR
MOCZAR, ELEMER	FR

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ROBERT LADISLAS	FR
ROBERT ALEXANDRE	FR
MOCZAR ELEMER	FR

APPL-NO: FR09401008
APPL-DATE: August 16, 1994

PRIORITY-DATA: FR09310054A (August 17, 1993)

INT-CL (IPC): A61K007/48 , A61K031/70

EUR-CL (EPC): A61K007/48 , A61K031/70

ABSTRACT:

Composition for the treatment or prevention of the symptoms of connective tissue ageing, characterized in that it contains one or more oligosaccharides with 2 to 5 oligosaccharide residues or a derivative of said oligosaccharide (s) containing a hydrophobic residue, with the proviso that one galactose residue be present in a non-reducing terminal position of said oligosaccharide(s).